

盐穗木 *HcPEAMT* 基因的克隆及表达分析

常 丹, 张 霞, 张富春*

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘 要: 依据盐穗木编码 PEAMT 的 EST 序列设计引物, 通过快速扩增 cDNA 末端技术, 获得盐穗木磷酸乙醇胺甲基转移酶(phosphoethanolamine N-methyltransferase, PEAMT)全长 cDNA, 命名为 *HcPEAMT*。序列分析表明 *HcPEAMT* 基因开放阅读框为 1 482 bp, 编码 494 个氨基酸, 推测分子量为 56.3 kD, 理论等电点为 5.51。保守结构域分析表明, *HcPEAMT* 含有 2 个独立的 S-腺苷甲硫氨酸依赖性甲基转移酶的保守结构域, 每个结构域含有 4 个基序。系统进化树分析确认 *HcPEAMT* 与盐生植物盐角草的亲缘关系较近。实时荧光定量 PCR 分析表明, 盐胁迫 3 h 时, 盐穗木同化枝和根中 *HcPEAMT* 基因的表达迅速上调并达到最大值, 分别为对照的 4.3 倍和 6.7 倍。脱落酸(ABA)胁迫 3 h 时, 同化枝中 *HcPEAMT* 的表达量达到最高, 而根中 *HcPEAMT* 的表达在 12 h 才达到最高, 表达量分别为对照的 2.6 和 2.5 倍。研究结果表明, *HcPEAMT* 基因表达受盐胁迫的强烈诱导, 也受 ABA 胁迫的诱导。该研究结果有助于阐明 *HcPEAMT* 基因表达与植物抗逆性的相关性。

关键词: 盐穗木; 磷酸乙醇胺甲基转移酶(PEAMT); 盐胁迫; 脱落酸胁迫; 基因表达

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of *HcPEAMT* Gene from *Halostachys caspica*

CHANG Dan, ZHANG Xia, ZHANG Fuchun*

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: Primers for phosphoethanolamine N-methyltransferase(PEAMT) gene from the halophyte *Halostachys caspica* were designed according to the EST sequence, and the full length cDNA of PEAMT gene was cloned by using RACE (rapid amplification of cDNA ends). The obtained cDNA was named as *HcPEAMT*. Sequence analysis indicated that *HcPEAMT* contains an open reading frame(ORF) of 1 482 bp, which encodes 494 amino acids with a molecular weight of 56.3 kD and a theoretical pI of 5.51. Conserved domain analysis showed that *HcPEAMT* has two separate conserved domains of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, and each domain contains four motifs. Phylogenetic tree analysis indicated that *HcPEAMT* was closer to the halophyte of *Salicornia europaea*. Real time quantitative PCR results showed that the expression of *HcPEAMT* gene in assimilating branches and roots after salt stress for 3 h was rapidly up-regulated and reached the highest, which was 4.3-fold and 6.7-fold of that of the respective controls. When stressed by abscisic acid(ABA), the expression of *HcPEAMT* gene in assimilating branches and root reached the highest level at 3 and 12 h, and about 2.6-fold and 2.5-fold of the controls, respectively. These results indicated that the expression of *HcPEAMT* gene was strongly induced by salt stress, and also by ABA stress. Our results would help to clarify the relationship between *HcPEAMT* expression and

收稿日期: 2014-04-11; 修改稿收到日期: 2014-06-05

基金项目: 国家“973”计划前期研究专项(2012CB722204); 新疆生物资源基因工程重点实验室开放课题(XJDX0201-2012-05)

作者简介: 常 丹(1987—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: changdan151991@163.com

* 通信作者: 张富春, 博士, 教授, 主要从事分子生物学与基因工程研究。E-mail: zfcxju@gmail.com

plant resistance.

Key words: *Halostachys caspica*; phosphoethanolamine N-methyltransferase (PEAMT); salt stress; abscisic acid stress; gene expression

植物通过多种途径协同作用来响应各种胁迫,其中渗透调节途径起着重要的作用。甘氨酸甜菜碱(glycine betaine, GlyBet)是一种无毒渗透调节物质,能够维持高盐浓度下细胞的渗透平衡和膜的有序性,并有效地稳定酶的结构^[1-3];而磷酸乙醇胺甲基转移酶(phosphoethanolamine N-methyltransferase, PEAMT)是 GlyBet 生物合成过程中的限速酶^[4-5]。

近年来研究表明,PEAMT 基因在植物根系统发育和维持根外胚层细胞完整性的磷脂新陈代谢中起决定性的作用^[6-7]。盐胁迫下,菠菜叶中 PEAMT 基因的表达量和酶活性都增加 10 倍左右,这与菠菜抵御盐渍时对 GlyBet 含量的需求增加是一致的^[8]。拟南芥 *peamt* 突变株 *t365* 对盐渍胁迫高度敏感,且突变株出现雄性不育、叶片白化、早衰等异常形态学表现^[9]。因此,PEAMT 基因不仅增强植物应对盐胁迫的能力,还参与植物根系及花粉的正常发育。脱落酸(ABA)作为植物的抗逆诱导因子,参与逆境相关信号的转导,启动植物体内的应激反应,可有效激活并提高植物抵御逆境的能力。植物的许多基因如脱水蛋白、蛋白磷酸酶、泛素蛋白连接酶等基因受外源 ABA 和盐的诱导^[10]。ABA 可诱导干旱胁迫下 K^+ 释放通道基因 *GORK* 的表达^[11]。盐和 ABA 都可诱导高粱甜菜碱醛脱氢酶基因的表达上调和 GlyBet 积累。而 ABA 生物合成抑制剂氟草酮可使 ABA 含量和甜菜碱醛脱氢酶的 mRNA 表达下调。这表明盐诱导 GlyBet 和甜菜碱醛脱氢酶 mRNA 的积累与 ABA 有关^[12]。

盐穗木(*Halostachys caspica*)隶属藜科(*Chenopodiaceae*)盐穗木属(*Halostachys*),生长于荒漠、半荒漠盐碱地,对盐分适应性极强,是主要的盐土荒漠植物之一,并成为植物群落的优势种或支配种^[13-14]。通过典范对应分析塔里木河中下游不同类型植物群落,表明盐穗木群落能耐受最大的盐胁迫^[15]。同时盐胁迫下,盐穗木植株内的甜菜碱含量与其耐盐性呈正相关^[14]。目前,对盐穗木的研究主要集中在生态学、逆境生理和生物化学、药理学等方面,但对其耐盐基因的挖掘及耐盐分子机制等方面仍缺乏系统性研究^[16-17]。根据本实验室前期通过盐穗木盐胁迫下抑制差减文库筛选技术及反向 Northern

点杂交和半定量逆转录,实时定量 PCR 确定的若干与盐胁迫相关基因^[18],选取编码 PEAMT 基因的 EST-Hc3f11,通过 RACE 和 RT-PCR 技术扩增其全长 cDNA,进行生物信息学分析,同时探讨盐和 ABA 胁迫下不同时间点和不同组织的表达模式,为深入研究盐和 ABA 胁迫诱导盐穗木 PEAMT (*HcPEAMT*)基因的表达和耐盐功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

盐穗木种子采集于新疆五家渠 103 团盐碱地。实验室去壳后,播种于土、珍珠岩、蛭石(2:1:1)的混合基质中,于温室(温度 23℃~26℃,光照 16 h/d 3 000 lx,相对湿度 40%~60%)中培养,以 3 个月左右的盐穗木为试验材料。

1.2 方 法

1.2.1 盐穗木总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 称取 0.1 g 盐穗木同化枝迅速置于液氮中充分研磨,采用 RNA prep pure 植物总 RNA 提取试剂盒(Tiagen 公司)提取盐穗木总 RNA,进行定量和电泳检测。采用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa 公司),依据说明书合成 cDNA 第一条链。

1.2.2 5'末端快速克隆 根据盐胁迫下盐穗木抑制差减文库中 *HcPEAMT* 基因的 EST(GenBank 登录号 HS586448)序列,设计 5'-RACE 扩增上游引物(5'-CATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCC-3')和下游引物(5'-CCGAATTTACTGCAATTTTA-ATCTCCCGG-3')。用 5'-Full RACE Kit(TaKaRa 公司)进行 5'-cDNA 末端扩增,回收目的基因连接与 pMD18-T 载体,并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。挑选菌液 PCR 及质粒酶切鉴定的阳性克隆,送上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.3 *HcPEAMT* 基因 cDNA 片段的克隆 将 5'-RACE 扩增所获得的 5'-cDNA 序列与已知 EST 序列进行拼接,得到 *HcPEAMT* 基因全长序列。根据拼接得到的全长序列设计扩增开放阅读框的上游引物(5'-GAAGATCTTACTCCAATTTTAGTCT-CCTATAA-3')和下游引物(5'-TTATGTAATC-CTTTTGTGGCAACGAAC-3')。以盐穗木同

化枝的 cDNA 为模板使用 Ex Taq 酶扩增目的基因,回收目的基因与 pMD18-T 载体连接,并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。挑选菌液 PCR 及质粒酶切鉴定的阳性克隆,送上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.4 HcPEAMT 生物信息学分析 利用 ExPASy ProtParam(http://expasy.org/tools/pi_tool.html)分析 HcPEAMT 蛋白的理化性质及疏水性;利用 NCBI CDD 数据库分析蛋白质的保守结构域;依据 SignalP4.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)软件预测蛋白质的信号肽;Cell-PLoc 2.0 PSORT(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>)预测蛋白质的亚细胞定位;GOR4(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl)软件预测蛋白质的二级结构;NetPhos(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>)分析蛋白质的磷酸化位点;NPS Prosite Scan(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/pattern_prosite.pl)分析蛋白活性位点;利用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树^[19-20]。

1.2.5 胁迫处理后 HcPEAMT 组织特异性表达分析 生长至 3 个月左右的盐穗木,分别用 600 mmol/L NaCl、50 μ mol/L ABA 胁迫处理 0、3、6、12 和 24 h 后,称取 0.1 g 盐穗木的同化枝、根,样品迅速冻存于液氮中备用。采用 RNA prep pure 植物总 RNA 提取试剂盒(Tiagen 公司)分别提取 600 mmol/L NaCl、50 μ mol/L ABA 胁迫处理 0、3、6、12 和 24 h 的同化枝、根的总 RNA,使用 Prime Script RT reagent Kit(TaKaRa 公司)反转录合成 cDNA 第一条链。根据 HcPEAMT 的 cDNA 序列设计上游引物(5'-CCTGGTGGCAAAGTTCTGATT-3')和下游引物(5'-CAACCGCCAACTATGTCATCG-3');以 β -actin(上游引物 5'-CCAAAGGCCAACAG-AGAGAAGA-3',下游引物 5'-GAGACACACCAT-CACCAGAAT-3')基因作为内参基因。取 1.0 μ L cDNA 参照带有 ROX 的 Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG(Invitrogen 公司)试剂盒说明书进行 RT-PCR。RT-PCR 反应参数为:94 $^{\circ}$ C 15 s;94 $^{\circ}$ C 30 s;56 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 30 s;40 个循环;72 $^{\circ}$ C 2 min。经 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪器检测,数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

2 结果与分析

2.1 HcPEAMT 基因的克隆

根据盐穗木抑制差减文库 HcPEAMT 的 EST

(GenBank 登录号 HS586448)序列,通过 5'-RACE 扩增 5'-cDNA 末端,5'-RACE 产物长约 500 bp。并与 EST 序列拼接获得 HcPEAMT 基因全长的 cDNA。根据拼接序列设计引物扩增出与预测长度一致的 HcPEAMT 的 ORF(GenBank 登录号 KJ645899),ORF 为 1 482 bp(图 1),ORF 编码 494 个氨基酸的蛋白质。

2.2 HcPEAMT 生物信息学分析

通过在线 EXPASY 的 ProtParam 软件对 HcPEAMT 基因编码蛋白的理化性质进行分析表明,该蛋白的分子式为 C₂₅₂₈H₃₈₉₆N₆₅₈O₇₅₃S₂₃,理论分子量为 56.3 kD,理论等电点为 5.51,脂肪系数为 76.54,不稳定系数为 34.6。利用在线 NCBI 的保守结构域数据库(Conserved Domain Database, CDD),对 HcPEAMT 蛋白的保守结构域进行预测。结果表明:HcPEAMT 具有 2 个 S-腺苷甲硫氨酸结合位点,2 个独立的 S-腺苷甲硫氨酸依赖性甲基转移酶的保守结构域含有 4 个基序,属于 S-腺苷甲硫氨酸依赖性甲基转移酶超家族(图 2)。利用 SignalP 4.0 Server 软件对 HcPEAMT 蛋白进行信号肽的预测,根据人工神经网络算法可知:第 38 位残基具有最高的综合剪切位点分值 0.113,第 37 位残基具有最高的信号肽分值 0.141。由于从该蛋白的 N 端至第 70 位氨基酸之间信号肽分值和综合剪切分值无明显峰值(<0.5),说明 HcPEAMT 蛋白的 N 端不存在剪切位点,表明其不包含信号肽,推测其为非分泌蛋白。利用 Cell-PLoc 2.0PSORT 在线工具预测 HcPEAMT 蛋白的亚细胞定位,分析结果表明其定位于细胞质中。利用在线软件 GOR4 对 HcPEAMT 蛋白的二级结构进行预测表明,该蛋白主要由 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链构成。无规则卷曲是 HcPEAMT 蛋白二级结构中主要的结构元件。利用在线 ExPASy 的 ProtParam 软件对 HcPEAMT

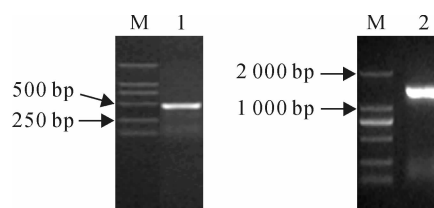


图 1 HcPEAMT 基因的克隆

M, DL2000;1. HcPEAMT-5'-RACE;2. HcPEAMT-开放阅读框扩增

Fig. 1 Cloning of HcPEAMT gene

M, DL2000;1. HcPEAMT-5'-RACE;

2. Amplification of HcPEAMT-ORF

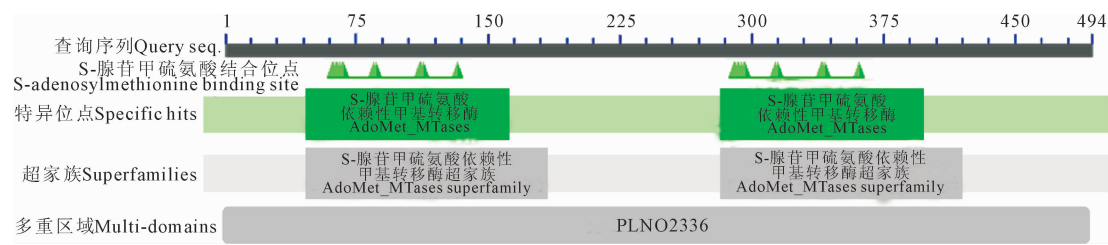


图 2 HcPEAMT 蛋白保守结构域

Fig. 2 HcPEAMT conservative protein domain structure

表 1 HcPEAMT 在 NPS 中活性位点预测分析

Table 1 Scanning of HcPEAMT for the site/signatures against proscan database in NPS

名称 Formal name	序列号 Prositeaccess number	膜体类型 Motif model	氨基酸序列 Amino acid sequence	概率值 Randomized probability
cAMP-和 cGMP-依赖性蛋白激酶磷酸化位点 cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site	PS00004	[RK](2)-X-[ST]	171-174 KRKS	1.572e-03
蛋白激酶 C 磷酸化位点 Protein kinase C phosphorylation site	PS000 05	[ST]-X-[RK]	218-220SKK, 273-275TTK, 343-345TKK, 473-475SAK, 479-481TAK	1.423e-02
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 Casein kinase II phosphorylation site	PS00006	[ST]-X(2)-[DE]	38-41SDLD, 136-139SDEE, 234-237SKDD, 273-276TTKE, 279-282SMLD, 346-349TYPE, 461-464SEED	1.482e-02
酪氨酸激酶磷酸化位点 Tyrosine kinase phosphorylation site	PS00007	[RK]-X(2,3)-[DE]-X(2,3)-Y	242-249KFLDTSQY	4.074e-04
N-豆蔻酰化位点 N-myristoylation site	PS00008	G-{EDRKHPFYW} × (2)-[STAGCN]-{P}	64-69GAGIGR, 79-84GQVIAL, 197-202GSGNSY, 269-274GGHETT, 293-298GCGIGG, 295-300GIGGGD, 313-318GIDLSV, 330-335GLKCAV, 470-475GGWSAK, 487-492GLFVAN	1.397e-02

蛋白的疏水性/亲水性进行预测, GRAVY 值为 -0.441, 为亲水性蛋白。

2.3 活性位点和磷酸化位点分析

磷酸化是生物体内一种普遍的调节方式, 在细胞信号转导和蛋白调控过程中起着重要作用。磷酸化位点分析表明, HcPEAMT 蛋白含有 13 个丝氨酸、4 个苏氨酸、8 个酪氨酸磷酸化位点。用 NPS(network protein sequence analysis) 的 Prosite Scan 对 HcPEAMT 蛋白活性位点分析结果表明, HcPEAMT 有 4 类磷酸化位点和 1 类豆蔻酰化位点(表 1)。这是 HcPEAMT 酶发挥催化作用所必需的。

2.4 系统进化分析

通过 NCBI 数据库检索 HcPEAMT 的同源蛋白序列, 使用 MEGA5.0 软件构建系统进化树。结果显示 HcPEAMT 与盐角草、辽宁碱蓬、粳稻碱蓬、海滨碱蓬聚类在一起(图 3)。碱蓬类植物多生长于碱湖周围和盐碱地上, 属于盐生植物群落, 而 HcPEAMT 蛋白与这些盐生植物的蛋白序列聚类在一起, 说明 HcPEAMT 具有耐盐性相关的特性。

2.5 实时荧光定量 PCR 分析盐、ABA 胁迫下 HcPEAMT 基因的表达

采用 RT-PCR 方法, 以 β Actin 作为内参, 分别



图 3 不同植物 PEAMT 氨基酸序列的系统进化树分析

图中分支点的数字表示 Bootstrap 验证中基于 1 000 次重复该节点可信度的百分比; 标尺代表遗传距离

Fig. 3 Phylogenetic tree of PEAMT amino acid sequences from different plants

The number on the branches indicate the reliability percent of Bootstrap values based on 1 000 replications; the scale bar represents genetic distance

检测不同时间点盐穗木根、同化枝 *HcPEAMT* mRNA 转录水平的变化。研究结果(表 4)表明, 600 mmol/L NaCl 胁迫处理后, *HcPEAMT* 在同化枝、根中的表达明显上调; 同化枝和根中 *HcPEAMT* 的表达都在 3 h 时达到最高, 同化枝中表达量约为对照组的 4.3 倍, 而根中表达量较高约为对照组 6.7 倍。然后随时间的增加而表达量降低, 其余时间

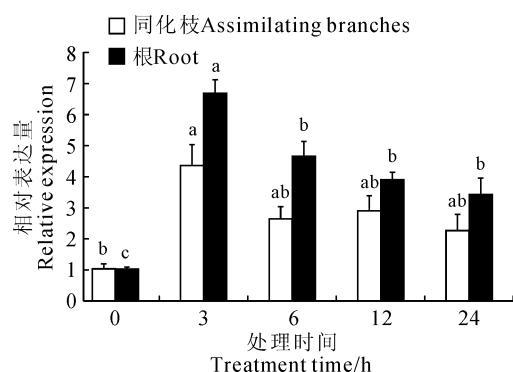


图4 盐穗木同化枝和根中 *HcPEAMT* 响应盐胁迫的相对表达分析

不同小写字母表示器官内不同处理时间在 0.05 水平存在显著性差异;下同

Fig. 4 Relative expression of *HcPEAMT* response to salt-stress in assimilating branches and roots
Different lowercase letters represent significant difference among treatment time in the same organ at 0.05 level; The same as below

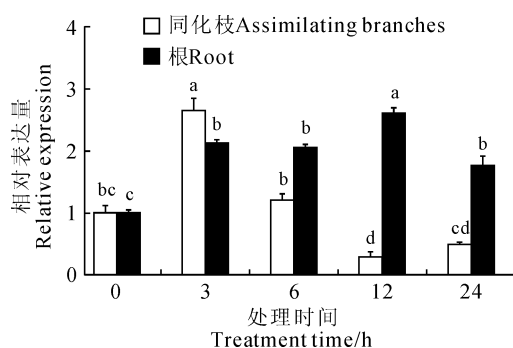


图5 盐穗木同化枝和根中 *HcPEAMT* 响应 ABA 胁迫的相对表达分析

Fig. 5 Relative expression of *HcPEAMT* response to ABA-stress in assimilating branches and roots

点根中的表达量都显著高于对照组,而同化枝虽然比对照高,但差异不显著(图4)。

图5显示,用 50 $\mu\text{mol/L}$ ABA 胁迫处理后,同化枝中 *HcPEAMT* 的表达量在 3 h 时达到最高,约为对照组的 2.6 倍,然后随时间的增加显著降低;根中 *HcPEAMT* 表达在 12 h 时达到最大值,约为对照组的 2.5 倍,其余时间点根中的表达量都显著高于对照组。

3 讨论

植物 *PEAMT* 基因是甜菜碱合成中的限速酶,它通过促进渗透物质的合成提高植物的抗逆性^[21];还参与脂类物质合成从而调控植物的生长发育^[7-10]。同时 *PEAMT* 介导传递植物胁迫响应信号

第二信使磷脂酸合成的双向调控机制^[7]。本实验克隆得到的 *HcPEAMT* 编码的蛋白序列具有植物 *PEAMT* 家族普遍含有的 2 个保守的 S-腺苷甲硫氨酸依赖性甲基转移酶的保守结构域,表明该蛋白确实属于 *PEAMT* 家族^[22-23]。保守结构域分别为 N 端和 C 端结构域,每个结构域分别含有 4 个基序。已有研究表明分别定点突变小麦 2 个结构域中基序 I 的氨基酸(谷氨酸替代甘氨酸),N 端结构域的突变体其 *PEAMT* 活性丧失,而 C 端结构域的突变体仍具有酶活性^[24]。也有研究者将 C 端结构域缺失后,*PEAMT* 仅能催化第一步反应^[11]。这表明两个结构域在 *PEAMT* 催化过程中都必不可少。*HcPEAMT* 与盐角草、辽宁碱蓬、梗稻碱蓬、海滨碱蓬 *PEAMT* 聚类在一起,而这几种植物都是耐盐性植物,进一步表明此基因与盐穗木耐盐性相关。

HcPEAMT 不稳定系数为 34.6 (<40),根据 Guruprasad 算法,当不稳定系数大于 40 时,预测蛋白在试验中不稳定;相反,当不稳定系数小于 40 时,即该蛋白比较稳定。因此 *HcPEAMT* 蛋白在试验中为稳定蛋白。对 *HcPEAMT* 蛋白进行信号肽的预测与亚细胞定位结果相一致,都表明 *HcPEAMT* 定位于细胞质,这与 Charron 等通过细胞分级分离技术观察到此酶只定位于细胞质中,且不与膜结合是一致的^[24]。通过细胞分级分离技术也观察到此酶只定位于细胞质中,且不与膜结合^[25]。这也与该酶只在细胞质中催化合成磷酸胆碱的作用相一致^[26]。由于蛋白质的疏水性通常依据蛋白的 GRAVY 值采预测,而 GRAVY 值通常分布在 2 至 -2 之间,如该值为正值,则判定该蛋白为疏水蛋白;相反,则判定为亲水蛋白。根据这个原则,分析 *HcPEAMT* 蛋白的结果表明,*HcPEAMT* 蛋白的 GRAVY 值为 -0.441。整条多肽链表现为亲水性,没有明显的疏水区。由此,推测 *HcPEAMT* 蛋白是一种可溶性蛋白。同样研究表明拟南芥 *PEAMT* 也是亲水性的^[25]。此外,*HcPEAMT* 蛋白具有 4 类磷酸化位点,这与该基因催化磷酸乙醇胺三次甲基生成磷酸胆碱有关。

已有研究表明通过抑制性消减杂交技术筛选出的盐胁迫应答基因包含 *PEAMT*,在 NaCl 模拟的盐胁迫下 *PEAMT* 的表达明显上调,促使植物积累较多的渗透调节物质 GlyBet^[18,27-28]。盐角草 (*Salsola herbacea*) *PEAMT* 基因启动子区序列含有 ABA 诱导元件,表明植物 *PEAMT* 基因在转录水平上受 ABA 胁迫的调控^[29]。同时玉米 (*Zea mays*)

PEAMT1(*ZmPEAMT1*)基因启动子序列也包含胁迫响应元件。实时定量 PCR 分析表明 *Zm-PEAMT1* 的表达受盐胁迫诱导和高温抑制^[30]。同样,本研究表明盐穗木同化枝和根中 *HcPEAMT* 受盐和 ABA 的诱导,且盐诱导 *HcPEAMT* 基因的表达量在根和同化枝都明显高于 ABA 胁迫。这与大麦 *WPEAMT* 在盐处理后表达量增加 4 倍,而 ABA 处理增加 3 倍相一致^[24]。根系是植物主要的吸水器官,本研究也表明无论是盐、ABA 胁迫时,根中 *HcPEAMT* 的表达量都比同化枝高,且表达较为稳定。

盐胁迫 3 h 时,盐穗木同化枝和根中该基因的表达量都达到最高,分别约为对照组的 4.3 和 6.7 倍,说明 *HcPEAMT* 在组织和时间上都可以迅速响应盐胁迫,随着时间的递增 *HcPEAMT* 的表达虽然有所下降,但都明显高于对照组。这与盐渍化菠菜叶中 *PEAMT* 基因的 mRNA 丰度和酶活性均增加约 10 倍是一致的^[11],但与盐胁迫下滨藜(*At-riplex nummularia*) *AnPEAMT* 只在叶中转录水平增加,而在茎或根中无变化的结论不同^[31],可能是因为盐穗木的地上部分被同化为同化枝,而使得基因在不同植物组织的表达有所差异。同化组织被视为植物对胁迫最为敏感的部位,同样本研究表明 ABA 及盐胁迫下盐穗木同化枝中 *HcPEAMT* 都在 3 h 时立即响应胁迫,且表达量最高。而根响应

ABA 胁迫较慢,在 12 h 才达到最高,约为对照组的 2.5 倍;同化枝中 *HcPEAMT* 虽然在 3 h 表达量较高,约为对照组的 2.6 倍,但在 12 h 和 24 h 时表达量急剧降低,特别是 12 h 时比对照低约 3 倍。这与杜梨(*Pyrus betulae folia*) *PbPEAMT* 在 ABA 胁迫后表达丰度在 4 h 上调,然后随时间的增加而下降的趋势相一致^[32]。可能是因为 *PEAMT* 属于调节类蛋白,ABA 作为其效应分子在胁迫初期可以诱导 *HcPEAMT* 的快速高表达,使植物在短期内即可对胁迫做出应答,进而激活下游抗性基因或酶的表达;后期可能由于抗性基因的表达及渗透调节物质的增多,使得该基因对 ABA 的响应下降,说明 *HcPEAMT* 基因可能参与脱落酸介导的植物抗逆信号转导过程。现在我们的研究结果表明 *HcPEAMT* 的表达受到盐和 ABA 胁迫的诱导,但胁迫时该基因在植物体内所起的具体作用仍需通过 Northern 印迹,结合酶活性分析和转基因技术来进一步验证。

本实验从盐穗木中获得了 *HcPEAMT* 基因,并对其进行了生物信息学分析,同时探讨了盐穗木响应盐和 ABA 胁迫的基因表达变化,表明该基因能够参与盐穗木胁迫应答过程,为研究盐和 ABA 胁迫诱导的 *HcPEAMT* 基因表达与植物抗逆性的相关性奠定了基础。

参考文献:

- [1] CHEN T H H, MURATA N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress; mechanisms and biotechnological applications[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2011, **34**(1): 1—20.
- [2] GIRI J. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants[J]. *Plant Signaling Behavior*, 2011, **6**(11): 1 746—1 751.
- [3] ZHANG L X(张立新), LI SH X(李生秀). Research progress on relationships betaine and drought/salt resistance of plants[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2004, **24**(9): 1 765—1 771(in Chinese).
- [4] CHANG D(常 丹), ZHANG X(张 霞), ZHANG F CH(张富春). Research advances on phosphoethanolamine N-Methyltransferase in plant[J]. *Plant Physiology Journal* (植物生理学报), 2013, **49**(11): 1 155—1 159(in Chinese).
- [5] ZHANG B(张 波), ZHANG H G(张怀刚). Mechanism for glycinebetaine to improve plant salt resistance and its research advances in genetic engineering[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2005, **25**(9): 1 888—1 893(in Chinese).
- [6] CRUZ-RAMIREZ A, LOPEA-BUCIO J, RAMIREZ-PIMENTEL G, et al. The *xipotl* mutant of *Arabidopsis* reveals a critical role for phospholipid metabolism in root system development and epidermal cell integrity[J]. *The Plant Cell*, 2004, **16**(8): 2 020—2 034.
- [7] ALATORRE-COBOS F, CRUZ-RAMIREZ A, HAYDEN C A, et al. Translational regulation of *Arabidopsis* XIPTOL1 is modulated by phosphocholine levels via the phylogenetically conserved upstream open reading frame 30[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, **63**(14): 5 203—5 221.
- [8] NUCCIO M L, ZIEMAK M J, HENRY S A, et al. cDNA cloning of phosphoethanolamine N-methyltransferase from spinach by complementation in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of the recombinant enzyme[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(19): 14 095—14 101.
- [9] MOU Z L, WANG X Q, FU Z M, et al. Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility

- ity and salt hypersensitivity in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2002, **14**(9): 2 031—2 043.
- [10] LIU Y J, JI X Y, ZHENG L, *et al.* Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and salt stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, **14**: 9 979—9 998.
- [11] BECKERA D, ACHE P, WENKEL S, *et al.* Regulation of the ABA-sensitive *Arabidopsis* potassium channel gene *GORK* in response to water stress[J]. *Febs Letters*, 2003, **554**: 119—126.
- [12] SANEOKA H, REDA S I, MOGHAIEB R E A. Effect of salinity and abscisic acid on accumulation of glycinebetaine and betaine aldehyde dehydrogenase mRNA in sorghum leaves(*Sorghum bicolor*) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2001, **158**: 853—859.
- [13] ZHOU L J(周莲洁), YANG ZH M(杨忠敏), ZHANG F CH(张富春), *et al.* Expression analysis and cloning of GRAS transcription factor gene from *Halostachys caspica* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(6): 1 091—1 097(in Chinese).
- [14] WANG J H(王俊华), ZENG Y L(曾幼龄), YANG J(杨 洁), *et al.* Determination of glycinebetaine in *Kalidium foliatum* and *Halostachys caspica* chronical treatment with NaCl by RP-HPLC[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2007, **27**(3): 515—520(in Chinese).
- [15] LI T(李 涛), YIN L K(尹林克), YAN CH(严 成). Quantitative classification and ordination analysis on vegetation in the middle reaches of Tarim River[J]. *Arid Land Geography*(干旱地理), 2003, **26**(2): 173—179(in Chinese).
- [16] TAO D Y(陶大勇), WANG X D(王选东), LIU L L(刘利林), *et al.* Study on part component contents measurements and the activity effect of *Halostachys caspica* [J]. *Journal of Anhui Agri. Sci.* (安徽农业科学), 2009, **37**(4): 1 591—1 593(in Chinese).
- [17] TAO D Y(陶大勇). Research progress of *Halostachys caspica* [J]. *Journal of Anhui Agri. Sci.* (安徽农业科学), 2007, **35**(20): 6 083—6 084(in Chinese).
- [18] LIU L, WANG Y, ZENG Y L, *et al.* Identification and characterization of differentially expressed genes in the halophyte *Halostachys caspica* under salt stress[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2012, **110**: 1—12.
- [19] MA Y B(马燕斌), WU X(吴 霞), WANG X(王 霞), *et al.* Specific expression of *BnDGAT1* gene in *Brassica napus* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(10): 1 958—1 963(in Chinese).
- [20] CUI B(崔 波), JIANG S H(蒋素华), LIU J(刘 佳), *et al.* Cloning and expression analysis of API-like gene from *Sedirea japonica* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(9): 1 739—1 744(in Chinese).
- [21] SHANG Q M(尚庆茂), LI X F(李晓芬), ZHANG ZH G(张志刚). Molecular mechanisms of cross adaption in plants[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2007, **27**(9): 1 921—1 928(in Chinese).
- [22] PESSI G, KOCIUBINSKI G, MAMOUN C B. A pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium falciparum* involving phosphoethanolamine methylation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101**(16): 6 206—6 211.
- [23] BEGORA M D, MACLEOD M J R, MCCARRY B E, *et al.* Identification of phosphomethylethanolamine N-methyltransferase from *Arabidopsis* and its role in choline and phospholipid metabolism[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**(38): 29 147—29 155.
- [24] CHARRON J B F, BRETON G, DANYLUK J, *et al.* Molecular and biochemical characterization of a cold-regulated phosphoethanolamine N-methyltransferase from wheat[J]. *Plant Physiology*, 2002, **129**(5): 363—373.
- [25] BOLOGNESE C P, MCGRAW P. The isolation and characterization in yeast of a gene for *Arabidopsis* S-adenosylmethionine:Phosphoethanolamine N-methyltransferase[J]. *Plant Physiology*, 2000, **124**(4): 1 800—1 813.
- [26] EASTMOND P J, QUETTIER A L, KROON J T M, *et al.* Phosphatidic acid phosphohydrolase 1 and 2 regulate phospholipid synthesis at the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2010, **22**(8): 2 796—2 811.
- [27] XUE Y(薛 焱), WANG Y CH(王迎春), WANG T ZH(王同智). Physiological and biochemical mechanisms of an endemic halophyte *Reaumuria trigyna* Maxim. under salt stress[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2012, **32**(1): 136—142(in Chinese).
- [28] SAHU B B, SHAW B P. Isolation, identification and expression analysis of salt-induced genes in *Suaeda maritima*, a natural halophyte, using PCR-based suppression subtractive hybridization[J]. *BMC Plant Biology*, 2009, **9**(9): 1—25.
- [29] MA S Q(马赛箭), SU Q(苏 乔), WU S(吴 淞), *et al.* Isolation and transient expression assay of *PEAMT* gene promoter from *Salicornia europaea* [J]. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2008, **28**(8): 69—73(in Chinese).
- [30] WU S W, YU Z W, WANG F G, *et al.* Cloning, characterization, and transformation of the phosphoethanolamine N-methyltransferase gene(*ZmPEAMT1*) in maize(*Zea mays* L.) [J]. *Molecular Biotechnology*, 2007, **36**(2): 102—112.
- [31] TABUCHI T, KAWAGUCHI Y, AZUMA T, *et al.* Similar regulation patterns of choline monooxygenase, phosphoethanolamine N-methyltransferase and S-adenosyl-L-methionine synthetase in leaves of the halophyte *Atriplex nummularia* L. [J]. *Plant Cell Physiology*, 2005, **46**(3): 505—513.
- [32] LI H(李 慧), CONG Y(丛 郁), CHANG Y H(常有宏), *et al.* Cloning, sequence analysis and expression characterization of *Pb-PEAMT* gene in *Pyrus betulaefolia* Bunge[J]. *Plant Physiology Journal*(植物生理学报), 2012, **48**(5): 449—455(in Chinese).